

УДК 636.4:591.465.12:576.3/.7.086.83

МОДЕЛИРОВАНИЕ СИСТЕМ СОЗРЕВАНИЯ ООЦИТОВ СВИНЕЙ *in vitro**

Т.И. КУЗЬМИНА¹, Д.А. НОВИЧКОВА¹, Н.А. ВОЛКОВА²

На основе исследования роли структурных элементов фолликулов свиней в формировании зрелой яйцеклетки и превентивной оценки функционального статуса ооцита (BCB-тест) разработана система экстракорпорального дозревания свиных ооцитов, завершивших фазу роста *in vivo* или *in vitro*, которая позволяет получать до 45 % эмбрионов на стадиях поздней морулы и бластоцисты.

Ключевые слова: клеточные технологии репродукции, свинья, ооциты, эмбрионы, оплодотворение *in vitro*, BCB-тест.

Keywords: cell technology of reproduction, pig, oocytes, embryos, fertilization *in vitro*, BCB-test.

Возможность получения необходимого количества биологически полноценных нативных или реконструированных эмбрионов свиней *in vitro* позволит решить ряд важнейших проблем внедрения инновационных клеточных репродуктивных технологий (трансплантация эмбрионов, трансгенез, клонирование, получение эмбриональных стволовых клеток) в свиноводство, биомедицину, фармакологию (1-3). Несмотря на то, что основные подходы к методу разработаны и о рождении потомства из ооцитов, созревших *in vitro*, сообщается в научных публикациях, выход ооцитов на стадии метафазы II продолжает оставаться низким по сравнению с результатами, полученными *in vivo* (4). При оплодотворении свиных ооцитов, созревших *in vitro*, наблюдается высокая доля полиспермии, нарушений процесса формирования мужского пронуклеуса (5). Недостаточное число эмбрионов на стадии бластоцисты значительно лимитирует эксперименты по созданию линий эмбриональных стволовых клеток. Все это свидетельствует об актуальности разработки эффективных систем дозревания *in vitro*, позволяющих повышать выход зрелых яйцеклеток свиней.

Цель настоящего исследования — на основе использования маркеров ядерно-цитоплазматического созревания ооцитов (статуса хроматина и митохондриальной активности) *in vitro* смоделировать систему дозревания свиных ооцитов, завершивших фазу роста *in vivo* или *in vitro*, для их использования в клеточных репродуктивных технологиях.

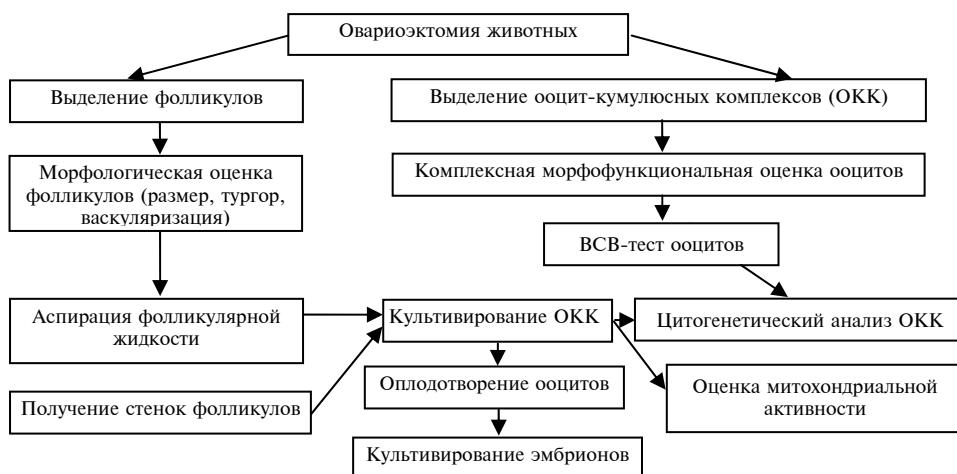
Методика. Объектом исследования служили ооцит-кумулюсные комплексы (OKK), выделенные от свиней породы ландрас (6-8 мес), соматические клетки овариальных фолликулов, доимплантационные эмбрионы. Ооцит-кумулюсные комплексы аспирировали из фолликулов диаметром 3-5 мм. Для получения оболочек фолликулов их оценивали по степени васкуляризации и тургору. Фолликулярную жидкость аспирировали из фолликулов диаметром 3-5 мм с высоким тургором и обширной сетью капилляров. Отбор OKK для экспериментов, оценку качества фолликулов, получение стенок фолликулов и фолликулярной жидкости, определение интенсивности флуоресценции MitoTracker Orange CMTMRos (M 7510; Molecular Probes, «Eugene, OR», США) в ооцитах проводили методами, описанными нами ранее (6, 7). Интенсивность флуоресценции (мКА/ооцит)

* Работа частично выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ, шифр проекта 2012-1.4-12-000-2021-009. При проведении исследований было использовано оборудование ЦКП «Биоресурсы и биоинженерия сельскохозяйственных животных» ГНУ ВИЖ Россельхозакадемии.

измеряли с помощью флуориметра (Nikon Photometry System P 100, «Nikon», Dusseldorf, Германия). Режимы культивирования и оплодотворения ооцитов свиней *in vitro*, а также культивирования доимплантационных эмбрионов соответствовали разработанным рекомендациям (6). Оценку функционального состояния исходной популяции ооцитов с помощью ВСВ-теста осуществляли согласно описанной нами ранее процедуре для ВСВ-теста ооцитов коров, модифицированной за счет уменьшения рабочей концентрации раствора бриллиантового кристаллического голубого — ВСВ (brilliant cresyl blue) (B-5388, «Sigma», США) до 13 мМ и времени обработки до 60 мин (8). По истечении периода воздействия ВСВ ооциты с голубой окраской цитоплазмы считывались как завершившие фазу роста (BCB^+), неокрашенные — как растущие (BCB^-). Статус хроматина ооцитов и эмбрионов оценивали по методу A. Tarkowski (9). Сравнивали три системы культивирования: в I использовали синтетическую питательную среду NCSU 23 (North Carolina State University), которую готовили по прописи R.M. Petters и K.D. Wells (1993), изложенной нами ранее в методических рекомендациях (6), с добавлением хорионического гонадотропина человека и хорионического гонадотропина лошади (по 10 МЕ) (основная модель — ОМ, контроль); к составу ОМ во II системе добавляли 10 % фолликулярной жидкости (ФЖ, диаметр фолликулов 3-5 мм), в III — стенки фолликулов (СФ, диаметр фолликулов 3-5 мм), в IV — 10 % ФЖ и СФ.

Для сравнения результатов, полученных в опытных и контрольных группах, использовали критерий χ^2 или *t*-критерий Стьюдента (статистическая программа Sigma Stat). Достоверность различия средних значений оценивали при трех уровнях значимости — $P < 0,05$; $P < 0,01$ и $P < 0,001$ для 3-5 независимых экспериментов.

Результаты. Общая схема опытов приведена на рисунке.



Моделирование систем дозревания ооцита — важная составляющая эмбриотехнологий. Развитие эмбрионов вне организма прямо зависит от того, насколько условия культивирования *in vitro* адекватны физиологическому процессу (10, 11). Популяция ооцитов, выделяемых из яичников свиней-доноров, гетерогенна. Прижизненное тестирование ооцитов с применением красителя ВСВ в качестве индикатора активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (G6PDH) позволяет использовать отобранные клетки для последующего культивирования, оплодотворения и получения эмбрионов. ВСВ выявляет интрацеллюлярную активность G6PDH — ключевого фер-

мента пентозофосфатного цикла, играющего важную роль в клеточном росте. В растущем ооците активность фермента повышается, к завершению роста — снижается. Нетоксичность указанного красителя при определении активности G6PDН была показана для овечьих ооцитов, независимо от их размера, а также при определении компетенции ооцитов к мейотическому дозреванию (12). Ранее обнаружено, что у свиней в фолликулах диаметром 3-5 мм содержится 71 % завершивших рост ооцитов (BCB^+) и 29 % — растущих (BCB^-) (7). In vivo ооциты созревают в фолликуле, функциональная активность его структурных элементов (клетки теки, гранулезы) и ФЖ обеспечивают завершение мейотического созревания и формирование зрелой яйцеклетки. В связи с этим для моделирования системы дозревания ооцитов свиней мы использовали стенки фолликула и фолликулярную жидкость, вводя эти компоненты в состав сред для культивирования. В экспериментах использовали клетки, которые по предварительной оценке в тесте с BCB были отнесены к группам завершивших рост и растущих ооцитов.

1. Показатели, характеризующие созревание ооцитов свиней при 44-часовом культивировании в разных системах

Система культивирования	BCB-диагностика	всего	Число ооцитов (доля, %)			
			мейоз		на стадии метафазы II	дегенерированных
			не реиницирован	реиницирован		
NCSU 23 + гормоны (контроль)	Б.д.	104	9 (9)	95 (91)	75 (72) ^a	28 (27)
	+	99	8 (8)	91 (92)	77 (78) ^b	25 (25)
	-	98	9 (9)	89 (91)	47 (48) ^c	24 (24)
NCSU 23 + гормоны + 10 % ФЖ	Б.д.	102	8 (8)	94 (92)	81 (79) ^d	23 (23)
	+	100	7 (7)	93 (93)	83 (83) ^e	22 (22)
	-	96	9 (9)	87 (91)	51 (53) ^f	22 (23)
NCSU 23 + гормоны + СФ	Б.д.	104	10 (10)	94 (90)	83 (80) ⁱ	24 (23)
	+	98	7 (7)	91 (93)	82 (84) ^k	22 (22)
	-	95	8 (8)	87 (92)	48 (51) ^l	22 (23)
NCSU 23 + гормоны + 10 % ФЖ + СФ	Б.д.	105	9 (9)	96 (91)	85 (81) ^m	18 (17)
	+	101	7 (7)	94 (93)	89 (88) ⁿ	15 (15)
	-	98	9 (9)	89 (91)	57 (58) ^o	16 (16)

П р и м е ч а н и е. Б.д. — без диагностики, «+»/«-» — результаты теста; NCSU 23 — синтетическая питательная среда; гормоны — 10 МЕ хорионического гонадотропина человека + 10 МЕ хорионического гонадотропина лошади; ФЖ — фолликулярная жидкость (диаметр фолликулов 3-5 мм); СФ — стенки фолликулов (диаметр фолликулов 3-5 мм). Достоверность различия сравниваемых значений (критерий χ^2 -квадрат) для a:c; b:c; d:f; e:f; i:l; k:l; m:o; n:o $P < 0,05$.

В таблице 1 отражены данные экспериментов по культивированию растущих и завершивших рост ооцитов в различных системах. Через 44 ч дозревания основная часть ооцитов во всех группах реиницировала мейоз (91-93 %), лишь 7-10 % клеток оставались на стадии диплотены. Проявились достоверные различия по числу вступивших в стадию метафазы II ооцитов между контрольным вариантом, когда BCB -тест не проводили, и всеми исследуемыми группами при использовании клеток, завершивших рост до начала культивирования (BCB^+). В 78-88 % этих ооцитов (независимо от системы культивирования) произошло мейотическое созревание. Из яйцеклеток, отнесенных перед культивированием к категории растущих, через 44 ч окончательной стадии мейоза достигли 48-58 %. Кроме того, во всех исследуемых группах мы не обнаружили достоверных различий по числу ооцитов с дегенерированным хроматином. То есть в целом была показана возможность достижения ооцитами, не завершившими fazу роста, стадии метафазы II *in vitro*.

Формирование зрелой яйцеклетки, готовой к оплодотворению и последующему развитию эмбрионов, представляет собой комплексный процесс преобразований хроматина (ядерное созревание) и компартментов ооплазмы. Все события в клетке, так или иначе связанные с энергетиче-

ским обменом, зависят от клеточного дыхания, важная составляющая которого — окислительное фосфорилирование. Функциональная активность митохондрий детерминирует цитоплазматическое созревание ооцита (13). Ее определение позволяют разработать высокинформативные метаболические тесты биологической полноценности яйцеклеток. Использование прижизненных красителей, в частности MitoTracker Orange CMTMRos M 7510, специфически связывающегося с активными митохондриями, позволяет оценивать функциональный статус ооцита.

2. Интенсивность флуоресценции в ооцитах свиней при 44-часовом культивировании в разных системах (MitoTracker Orange CMTMRos, мкА/ооцит)

Система культивирования	BCB-диагностика	<i>n</i>	Интенсивность флуоресценции
NCSU 23 + гормоны (контроль)	Б.д.	47	178,0±17,9 ^a
	+	44	169,4±21,3 ^b
	-	39	390,3±17,2 ^c
NCSU 23 + гормоны + 10 % ФЖ	Б.д.	45	181,3±18,6 ^d
	+	41	151,1±17,1 ^e
	-	38	395,4±21,2 ^f
NCSU 23 + гормоны + СФ	Б.д.	45	168,9±18,1 ^g
	+	41	142,0±22,8 ^k
	-	37	376,2±15,3 ^l
NCSU 23 + гормоны + 10 % ФЖ + СФ	Б.д.	45	158,4±15,1 ^m
	+	44	118,9±17,4 ⁿ
	-	37	281,0±15,7 ^o

П р и м е ч а н и е. Б.д. — без диагностики, «+»/«-» — результаты теста; NCSU 23 — синтетическая питательная среда; гормоны — 10 МЕ хорионического гонадотропина человека + 10 МЕ хорионического гонадотропина лошади; ФЖ — фолликулярная жидкость (диаметр фолликулов 3-5 мм); СФ — стенки фолликулов (диаметр фолликулов 3-5 мм). Достоверность различия сравниваемых значений (*t*-критерий Стьюдента) для b:c; a:c; d:f; e:f; j:l; k:l; m:o; n:o — *p* < 0,001, для c:o; f:o; l:o; b:n; e:n; m:n — *p* < 0,01.

При сравнении интенсивности флуоресценции MitoTracker Orange CMTMRos M 7510 в растущих и завершивших рост ооцитах свиньи после их дозревания в различных системах мы выявили достоверные различия во всех исследуемых группах (табл. 2). К завершению культивирования (44 ч) у BCB⁻ ооцитов отмечались высокие значения флуоресценции независимо от модели культивирования (см. табл. 2). Для BCB⁻ ооцитов после культивирования в среде с гормонами, фолликулярной жидкостью и стенками фолликулов показатели были ниже, чем у той же категории клеток, дозревавших в остальных системах. Обнаружились достоверные различия в интенсивности флуоресценции между BCB⁺ ооцитами, созревавшими в присутствии гормонов, структурных элементов фолликулов и фолликулярной жидкости, и BCB⁺ клетками в вариантах, когда в состав среды входили гормоны и фолликулярная жидкость. Факт снижение интенсивности флуоресценции использованного прижизненного красителя после культивирования можно оценивать как свидетельство завершения цитоплазматического созревания формирующейся яйцеклетки и подготовки к блоку мейоза на стадии метафазы II.

При изучении эффективности оплодотворения ооцитов и культивирования полученных свиных эмбрионов (табл. 3) на основе анализа частоты дробления и развития до стадий поздних морул и бластоцист была выявлена система, обеспечивающая дозревание ооцитов, завершивших fazу роста как *in vitro* (BCB⁻), так и *in vivo* (BCB⁺). Система обеспечивала высокий выход эмбрионов на стадиях поздних морул и бластоцист (соответственно 12 и 45 %) по сравнению с другим экспериментальными группами (в них этот показатель составил от 3 до 21 %).

Таким образом, было показано, что созревание завершивших fazу роста ооцитов свиней *in vivo* или *in vitro* в системе с фолликулярной жидкостью и стенками фолликулов благоприятно оказывается на формировании зрелой яйцеклетки *in vitro* и дальнейшем развитии эмбрионов. Оч-

видно, ввиду того, что основная роль клеток гранулезы — стероидогенез и эстрадиол активно вовлекается в процесс созревания яйцеклетки, при наличии соматических фолликулярных клеток (стенки фолликула) в средах для культивирования может дополнительно увеличиваться продукция эстрadiола, способствующего приобретению ооцитами компетенции к завершению мейотического созревания и формированию зрелой яйцеклетки.

3. Показатели развития у доимплантационных свиных эмбрионов из ооцитов, завершивших фазу роста *in vivo* и *in vitro*, в разных системах культивирования

Система культивирования	BCB-диагностика	Число ооцитов		Число морул, бластоцист, <i>n</i> (%)
		всего, <i>n</i>	дробящихся, <i>n</i> (%)	
NCSU 23 + гормоны (контроль)	Б.д.	109	23 (21) ^a	8 (7) ^A
	+	95	27 (28) ^b	11 (12) ^B
	-	92	8 (9) ^c	0
NCSU 23 + гормоны + 10 % ФЖ	Б.д.	103	32 (31) ^d	12 (12) ^D
	+	101	33 (33) ^e	15 (15) ^E
	-	95	12 (13) ^f	3 (3) ^F
NCSU 23 + гормоны + СФ	Б.д.	97	36 (37) ^j	16 (16) ^J
	+	99	41 (41) ^k	21 (21) ^K
	-	89	16 (18) ^m	4 (4) ^M
NCSU 23 + гормоны + 10 % ФЖ + СФ	Б.д.	109	47 (43) ⁿ	34 (31) ^N
	+	103	60 (58) ^o	46 (45) ^O
	-	98	24 (24) ^p	12 (12) ^P

Причание. Б.д. — без диагностики, «+»/«-» — результаты теста; NCSU 23 — синтетическая питательная среда; гормоны — 10 МЕ хорионического гонадотропина человека + 10 МЕ хорионического гонадотропина лошади; ФЖ — фолликулярная жидкость (диаметр фолликулов 3-5 мм); СФ — стенки фолликулов (диаметр фолликулов 3-5 мм). Достоверность различия сравниваемых значений (критерий χ^2 -квадрат) для а:c; b:c; d:f; e:f; D:F; E:F; j:m; k:m; J:M; K:M; n:o; n:p; o:p; a:j; a:n; B:N; b:o; B:O; M:P; F:P; c:p Р < 0,05.

Итак, на основе превентивной оценки функционального статуса ооцита (BCB-тест) с учетом маркеров ядерно-цитоплазматического созревания (составление хроматина и митохондриальная активность) разработана система экстракорпорального дозревания ооцитов, завершивших фазу роста *in vivo* или *in vitro*. Компонентами используемой при этом среды служат стенки фолликула и его жидкость. При использовании системы выход свиных эмбрионов на стадиях поздней морулы и бластоцисты достигает 45 %.

ЛИТЕРАТУРА

1. Niemann H., Kues W., Carnwath J.W. Transgenic farm animals: current status and perspectives for agriculture and biomedicine. In: Genetic engineering in livestock: Ethics of Science and Technology Assessment. Springer, Berlin, v. 34, 2009: 1-30.
2. Whyte J.J., Prather R.S. Genetic modifications of pigs for medicine and agriculture. Mol. Reprod. Dev., 2011, 78: 879-891.
3. Эрнст Л.К., Волкова Н.А., Зиновьева Н.А. Некоторые аспекты использования трансгенных технологий в животноводстве. Сельскохозяйственная биология, 2009, 2: 4-9.
4. Coy P., Romar R., Ruiz S., Cánovas S., Gadea J., Vázquez F., Matás C. Birth of piglets after transferring of *in vitro*-produced embryos pre-matured with R-roscovitine. Reproduction, 2005, 129(6): 747-755.
5. Hunter M. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. Rev. Reprod., 2000, 5: 122-130.
6. Кузьмина Т.И., Альм Х., Торнер Х. Методы получения эмбрионов свиней *in vitro*. СПб—Пушкин, 2008.
7. Кузьмина Т.И., Мурза Г.В., Маташина О.П., Новикова Н.О. Селекция донорских ооцитов свиней на основе BCB-теста. В сб. науч. тр.: Генетика и селекция в животноводстве: вчера, сегодня, завтра. СПб—Пушкин, 2010: 207-212.
8. Кузьмина Т.И., Торнер Х., Альм Х. Инновационные эмбриотехнологии в разработке животных: от фундаментальных исследований к практике. Достижения науки и техники АПК, 2010, 4: 66-68.
9. Tarkowski A. An air-drying method for chromosomal preparation from mouse eggs. Cytogenetics, 1966, 1: 394-400.
10. Yoshioka K., Suzuki C., Onishi A. Defined system for *in vitro* production of porcine embryos using a single basic medium. J. Reprod. Dev., 2008 Jun, 54(3): 208-213.

11. Tareq K.M., Akter Q.S., Khandoker M.A., Tsujii H. Selenium and vitamin E improve the in vitro maturation, fertilization and culture to blastocyst of porcine oocytes. *J. Reprod. Dev.*, 2012, 19(58/6): 621-628.
12. Rodriguez-Gonzalez E., Lopez-Bejar M., Velilla E., Paramio M.T. Selection of prepubertal goat oocytes using the brilliant cresyl blue test. *Theriogenology*, 2002, 57: 1397-1409.
13. El Shourbagy S.H., Spikings E.C., Freitas M., St John J.C. Mitochondria directly influence fertilisation outcome in the pig. *Reproduction*, 2006 Feb, 131(2): 233-245.

¹ГНУ Всероссийский НИИ генетики и разведения сельскохозяйственных животных Россельхозакадемии,

196601 г. Санкт-Петербург—Пушкин, Московское ш., 55а,
e-mail: prof.kouzmina@mail.ru, live8avis@mail.ru;

²ГНУ Всероссийский НИИ животноводства Россельхозакадемии,

142132 Московская обл., Подольский р-н, пос. Дубровицы,
e-mail: natavolkova@inbox.ru

*Поступила в редакцию
15 января 2013 года*

MODELLING OF MATURATION SYSTEMS FOR PORCINE OOCYTE *in vitro*

T.I. Kuzmina¹, D.A. Novichkova¹, N.A. Volkova²

Summary

A system of extracorporal maturation of growing and fully grown oocytes have been developed on the basis of research of a role of structural elements of porcine follicles in formation of mature oocytes and a preventive estimation of the functional status of oocytes (BCB-test). The cultivation of oocytes in the developed system allows to receive till 45 % of embryos at the stages of late morulae and blastocysts.

Новые книги

Коничев А.С., Цветков И.Л., Попов А.П. и др. **Практикум по молекулярной биологии:** Уч. пос. для вузов. М.: изд-во «КолосС», 2012, 151 с.

Представлены прописи для проведения цикла лабораторных работ, связанных с изучением строения и функций нуклеиновых кислот и белков и использованием наиболее широко распространенных методов современной молекулярной биологии. Наряду с работами, требующими современного и в ряде случаев достаточно дорогого оборудования и реактивов, приведены прописи выполнения элементарных работ, позволяющих тем не менее получить определенные качественные и количественные результаты, характеризующие свойства белков и нуклеиновых кислот. Каждая работа содержит теоретическое описание того или иного метода и наиболее важные аспекты его практического использования, целевое назначение всех необходимых реактивов и оборудования, подробное постадийное описание лабораторных операций. Все представленные в практикуме работы прошли апробацию в учебных и научных лабораториях МГОУ и ООО «Компания «Биоком» и снабжены иллюстрациями.

Яглов В.В., Яглова Н.В. **Основы частной гистологии:** Уч. пос. для вузов. М.: изд-во «КолосС», 2011, 432 с.

Программированное учебное пособие предназначено для получения базисных знаний по основам частной гистологии и объективного контроля (самоконтроль, текущий, промежуточный, итоговый) процессов формирования, выживаемости и восстановления знаний в ходе подготовки специалистов — ветеринарных врачей. Пособие является основой для организации программированного изучения морфологических дисциплин. Рассмотрены нервная, сенсорная, сердечно-сосудистая, эндокринная системы, система органов кроветворения и иммунной защиты, пищеварительная, дыхательная, мочевыделительная системы, кожный покров, половые системы самца и самки. Для студентов вузов по специальности «Ветеринария».

Костомахин Н.М. **Породы крупного рогатого скота:** Уч. пос. для вузов. М.: изд-во «КолосС», 2011, 120 с.

Описаны породы крупного рогатого скота, история их создания, методы разведения; современные состояния. дана классификация пород по ареалу и направлениям продуктивности. Освещены вопросы акклиматизации пород, рассмотрены пути сохранения исчезающих пород и совершенствования генофонда. После каждой главы помещены контрольные вопросы для самопроверки. Для студентов вузов по специальности «Зоотехния».